

La Component Resolved Diagnosis (CRD): esempio concreto di personalizzazione della diagnosi

B. Caruso, A. Ferrari, N. Melloni, M. Rocca, D. Nicolis, C. Cocco, P. Rizzotti

Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche ed Ematologiche, Azienda Ospedaliera di Verona, Ospedale Civile Maggiore-Borgo Trento, Verona

Riassunto

Negli ultimi anni, grazie alla tecnologia degli allergeni ricombinanti, derivata dagli studi di biologia molecolare applicati alla patologia allergica, risulta possibile l'analisi della reattività IgE alle singole componenti molecolari di un estratto allergenico.

Questo permette di definire la Component Resolved Diagnosis (CRD), in altre parole di identificare il profilo di reattività di un soggetto sensibilizzato per le singole componenti allergeniche, aumentandone la specificità.

Gli allergeni molecolari si possono classificare a seconda se identificano la reattività allergologica respiratoria o quella alimentare.

Risulta, inoltre, di fondamentale importanza identificare quegli allergeni molecolari la cui reattività immunoallergenica è in grado di collegare i due quadri clinici dei sintomi respiratori e dei sintomi di origine alimentare.

Le molecole meglio caratterizzate in questi ultimi anni, anche sotto il profilo diagnostico, sono quelle di origine vegetale appartenenti alla famiglia delle "Pathogenesis-related proteins" (PR-10), proteine del sistema di difesa dei vegetali.

Delle PR-10 fa parte il Bet v 1 allergene maggiore del polline della betulla responsabile di reazioni allergiche sia respiratorie che alimentari, con sintomatologia però limitata al cavo orale (sindrome orale allergica - SOA).

Un altro gruppo di allergeni molecolari ormai ben caratterizzato è quello della famiglia delle profiline

di cui fa parte il Bet v 2 (profilina della betulla), la cui immunoallergenicità risulta anche essa responsabile di più di una sintomatologia allergica.

Le differenti immunoreattività possono indicare anche una migliore o peggiore risposta alla immunoterapia; un esempio è rappresentato dalla reattività IgE alle graminacee: soggetti Phl p 1 (proteina "Beta - Expansin" delle graminacee) e Phl p 5 (Ribonucleasi) positivi e Phl p 7 (PR-10 delle graminacee e cross-reattivo con il Bet v 1) e Phl p 12 (profilina delle graminacee e cross-reattiva con Bet v 2) negativi risponderebbero meglio al vaccino. Quindi, l'avvento dei primi vaccini ricombinanti con Phl p 5 induce la necessità di caratterizzare correttamente la risposta IgE per tale antigene molecolare.

Per quanto riguarda la sensibilizzazione alimentare alle farine, la cui origine vegetale è comunque appartenente alle graminacee, deve essere presa in considerazione la sindrome da asma e/o anafilassi da sforzo, che sarebbe definita dalla immunoallergenicità della molecola omega-5-gliadina.

Un'altra serie di molecole che collegano il mondo vegetale sia pollinico che di origine alimentare sono le "Lipid Transfer Protein" (LTP) la cui reattività allergica sarebbe responsabile anche di sintomatologie gravi.

Risulta, quindi, oggi necessario comprendere l'effettivo collegamento clinico di un soggetto allergico e il suo profilo di immunoreattività per le singole componenti dell'allergene sospetto.

Summary

Component Resolved Diagnosis (CRD): in-vitro definition of allergic patient's profile

Molecular characterization of IgE reactivity of specific individual components of allergenic extracts is now possible

due to the technology of recombinant allergens derived from studies of molecular biology of allergic pathology.

The identification of the immunoreactivity to single allergenic components in allergic individuals allows to specify

cally define her/his allergic profile and obtain the so-termed Component Resolved Diagnosis (CRD).

Molecular allergens can be classified into those that induce the respiratory allergic reactivity and those that identify the food-related allergic pathology. It is also essential to identify those molecular allergens whose immunoreactivity is able to connect the two clinical conditions: respiratory symptoms and food allergic symptoms.

Proteins intervening in the defence system of plants belonging to the group of Pathogenesis-Related proteins (PR-10) are the best characterized molecules in the recent years. Within the Pr-10 group of allergens, Bet v 1, the major allergen from birch pollen, is responsible not only for allergic respiratory reactions but also for food allergic reactions (Oral Allergy Syndrome - SOA).

The family of profilin is another well characterized group of molecular allergens, which includes Bet v 2 (birch profilin), whose allergic immunoreactivity is also responsible for more than one allergic symptom.

Interestingly, response to immunotherapy can be predicted from immunoreactivity. For instance, in the case of IgE reactivity to grass pollen, subjects positive to Phl p 1 (protein "Beta-Expansin") and Phl p 5 (ribonuclease) and negative to Phl p 7 (PR-10 of grass and cross-reactive with

Bet v1) and to Phl p 12 (profilin of grass and cross-reactive with Bet v 2) seem to respond better to the vaccine.

Moreover, the availability of the first recombinant Phl p 5 vaccines suggests to characterize properly the IgE response to this molecular antigen.

As for the sensitisation to flour food, whose vegetal origin is still belonging to the grasses we should consider the syndrome of Wheat-Dependent Exercise-induced Anaphylaxis (WDEIA) that would be defined by allergic immunoreactivity to the omega-5 gliadin molecule.

Another series of molecules that connect vegetal world both of pollen and of food origin are the Lipid Transfer Protein, whose allergenic reactivity would also be responsible for severe symptoms.

In conclusion, understanding the relationship between allergic symptoms and the profile of immunoreactivity to the molecular components of an allergen in each individual is therefore crucial.

Key-words: Component Resolved Diagnosis, Molecular Allergens, Immunoreactivity profile, Pathogenesis-related proteins (PR-10), Birch Profilin (Bet v 2), Wheat-dependent Exercise-induced Anaphylaxis (WDEIA).

La patologia allergica IgE mediata è un importante problema sanitario che nei prossimi anni coinvolgerà il 25% della popolazione dei paesi industrializzati. L'identificazione corretta della immunoreattività di un soggetto allergico e la conseguente strategia terapeutica risulta, quindi, di notevole importanza diagnostica¹.

Recentemente la tecnologia propria della biologia molecolare ha permesso la purificazione e la sintesi delle molecole che sono strettamente legate alla immunoreattività allergica migliorando la specificità diagnostica soprattutto in vitro, fino alla definizione della Component Resolved Diagnosis (CRD)².

In questi anni anche gli studi di bio-informatica, come ad esempio il programma "Allergome" (che è in grado di analizzare le omologie strutturali delle molecole allergeniche), stanno chiarendo i concetti di crossreattività immunologica con conseguenti implicazioni diagnostiche³.

Il modello, che ha permesso lo sviluppo di nuove strategie, si è sviluppato attraverso lo studio degli allergeni che compongono il polline della betulla, in particolare del Bet v 1 (Pathogenesis-related protein: PR-10). L'approccio per l'identificazione di questa molecola è stato poi ampliato a tutte le molecole allergeniche attualmente presenti in commercio e prevede la caratterizzazione biochimica con conseguente purificazione della molecola nativa, la sintesi con tecnologia di biologia molecolare e il controllo della sua immunoreattività⁴.

Allergeni molecolari della betulla

Per quanto riguarda la patologia allergica sia respiratoria che da alimenti vegetali causata dalla sensibilizzazione al polline di Betulla, l'interesse diagnostico si è focalizzato sulle positività IgE rilevate contro i seguenti allergeni molecolari: Bet v 1 (Pathogenesis-related Protein PR-10), Bet v 2 (Ac-

tin-binding protein - Profilin) e Bet v 4 (Calcium Binding Protein).

La reattività alle singole componenti varia a seconda della localizzazione geografica del polline. Paesi come Finlandia, Svezia, Austria presentano positività IgE per Bet v 1 nel 98% dei soggetti sensibilizzati al polline di betulla mentre Italia e Svizzera presentano circa un 65% di positività. Per il Bet v 2 paesi come Finlandia e Svezia hanno positività tra il 2-12% e gli altri tra 20 e 43%. Per il Bet v 4 tutti i paesi nordici presentano positività tra il 5-11% mentre l'Italia è intorno al 27%⁵.

Nella casistica della popolazione afferente al nostro laboratorio abbiamo riscontrato IgE specifiche positive per Bet v 1 nel 67% dei casi, per Bet v 2 nel 64% e per Bet v 4 nel 20% (casistica: n=1040; periodo 2006-2009).

Recentemente la tecnologia del reflex testing negli analizzatori consente di adottare una strategia diagnostica di approfondimento nello studio della positività a IgE in soggetti sensibilizzati. Di conseguenza è stato possibile implementare flow chart, eseguibili in automatico, che tenendo conto dei livelli anticorpali di IgE dirette contro allergeni naturali, siano in grado di segnalare la successiva positività all'allergene molecolare.

Nella nostra esperienza, la regola prevede l'esecuzione di Bet v 1 e Bet v 2 in caso di positività al polline della betulla superiore a 0.50 KU/L. Per Bet v 4 l'indagine viene approfondita solo quando il paziente presenta positività anche per graminacee e parietaria essendo un allergene che si evidenzia nella polisensibilità dei soggetti ad erbe e piante (Fig. 1).

L'analisi di questi tre allergeni molecolari risulta utile anche nel definire la strategia vaccinnica, poiché rispondono meglio soggetti positivi solo per Bet v 1; nei soggetti positivi per Bet v 1, Bet v 2 e Bet v 4 la risposta è meno

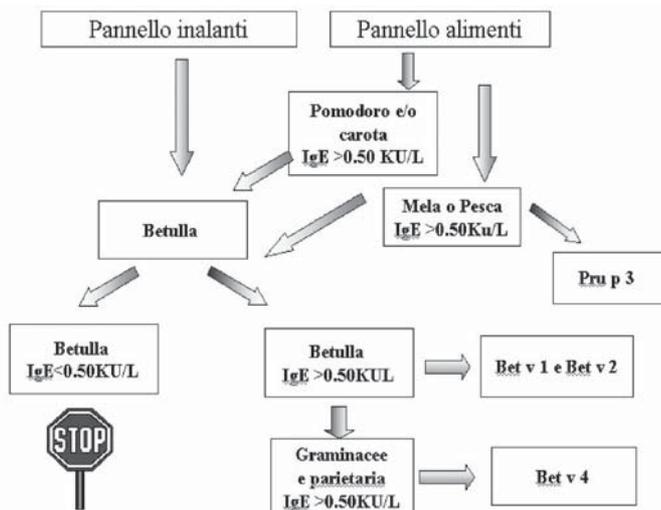


Figura 1. Flow chart: allergeni molecolari della betulla.

efficace, mentre risulta molto scarsa nei pazienti Bet v 1 negativi⁶.

Molecole come Bet v 1 e Bet v 2 sono presenti anche negli alimenti di origine vegetale (frutta e verdura). La positività sia nella diagnostica cutanea che in vitro identifica una polisensibilizzazione non sempre correlabile alla sintomatologia clinica. La positività IgE per Bet v 1 (altamente cross-reattivo con il Mal d 1 della mela) è stata collegata alla Sindrome Orale Allergica (SOA) e la positività per Bet v 2 (panallergene di pollini, frutta e verdura) è ancora controversa anche se la sintomatologia allergica sembrerebbe svilupparsi con una reazione di somma. L'allergene molecolare Bet v 1 è termolabile e gastrolabile mentre Bet v 2 è termostabile ma gastrolabile. Nel nostro laboratorio, nei pazienti con positività a mela e/o pomodoro e carota, vengono eseguite le IgE specifiche per betulla e successivamente per Bet v 1 e Bet v 2 in caso di concentrazioni di betulla superiore a 0.50 KU/L (Fig. 1).

Allergeni molecolari delle graminacee e delle farine

Per individuare il profilo molecolare degli allergeni delle graminacee, nel nostro laboratorio vengono eseguiti Phl p 1 (Beta-Expansin Protein) e Phl p 5 (ribonucleasi), mentre solo nei pazienti che presentano anche positività alla betulla vengono eseguiti Bet v 4 e Bet v 2, essendo queste molecole fortemente cross-reattive rispettivamente con Phl p 7 (calcium-binding protein) e Phl p 12 (profilina).

Definire il quadro molecolare IgE per le graminacee appare utile per la scelta vaccinic. I pazienti IgE positivi a Phl p 1 e Phl p 5 hanno buone possibilità di risposta protettiva dopo la vaccinoterapia, mentre la risposta è scarsa in caso di positività al solo Phl p 7 e Phl p 12⁶. Poiché i vaccini ricombinanti con Phl p 5 disponibili in commercio prevedono costi piuttosto elevati, la caratterizzazione molecolare diventa assolutamente necessaria nell'ottica della razionalizzazione nell'uso delle risorse.

Per quanto riguarda la sindrome dell'asma/anafilassi dipendente da esercizio fisico (WDEIA), lo studio molecolare della positività alle farine, di alimenti derivanti da piante appartenenti alla famiglia delle graminacee, ha indivi-

duato nell'omega-5-gliadina l'allergene molecolare responsabile della sintomatologia qualora i livelli di IgE siano superiori a 0.85 KU/L⁷.

Ai soggetti con positività alle graminacee (Phleum Pratense) superiore 30 KU/L vengono dosate, come reflex testing, le IgE specifiche per farina di grano e in tutti i pazienti con f4 superiore a 1 KU/L viene eseguito il dosaggio delle IgE per omega-5-gliadina. Nel periodo tra aprile 2007 e maggio 2009 in 214 soggetti con IgE per farina di grano superiore a 1 KU/L, 12 pazienti sono risultati con IgE per omega-5-gliadina (5.6%) superiori al limite decisionale, di cui quattro presentavano sicuramente la sindrome da asma/anafilassi da esercizio fisico.

Allergeni molecolari dei Dermatofagoidi e dei crostacei

Lo studio molecolare degli acari maggiori della polvere di casa ha individuato tre molecole di interesse allergologico: Der p 1 (proteasi cisteinica), Der p 2 (enzima ad attività sconosciuta) e il Der p 10 (tropomiosina). Anche la positività IgE per gli allergeni molecolari degli acari dipende dall'area geografica della popolazione: in Italia e in Francia circa il 95% dei soggetti allergici agli acari hanno IgE positive per Der p 1 e Der p 2 e il 10% Der p 10, mentre in Austria e Svezia la positività per Der p 10 risulta intorno al 18%⁸.

Anche per gli acari, la definizione del profilo permette di pronosticare la risposta alla immunoterapia specifica: i soggetti con positività IgE per Der p 1 e Der p 2 rispondono meglio dei soggetti solo Der p 10 positivi¹.

Il Der p 10 ha una forte cross-reattività con la tropomiosina dei crostacei (Pen a 1), in grado di provocare sintomatologia allergica alimentare⁹.

Nel nostro laboratorio per valori di IgE specifiche per Dermatophagoides pteronissinus superiori a 10 KU/L e/o gambero superiori a 2 KU/L, viene eseguito il dosaggio della tropomiosina come reflex testing, riscontrando una positività complessiva del 6% (casistica: n=332; periodo 2005-2009).

Comunque, nella nostra casistica solo il 25% dei soggetti con positività ad acari e gambero risulta anche positivo alla tropomiosina. Si può, quindi, concludere che non tutti i pazienti con IgE per acari e gambero condividono questo allergene molecolare.

Allergeni molecolari dell'Aspergillo

L'ipersensibilità agli antigeni di Aspergillus fumigatus è spesso sottovalutata. Il 15-20% dei soggetti con Asma Allergico presentano IgE specifiche per gli estratti antigenici di questa muffa.

I quadri clinici che caratterizzano questa sensibilizzazione, che viene definita Aspergillosi Broncopolmonare (ABPA), comprendono: l'asma allergico, l'alveolite allergica estrinseca, il "farmers lung", l'aspergillosi invasiva e l'aspergilloma.

Viene indicato come allergene molecolare specifico, soprattutto nei soggetti affetti da fibrosi cistica, l'antigene Asp f 6 (MnSOD, superossido-dismutasi, cross-reattiva anche con l'analogo enzima umano e con Hev b 10, allergene molecolare del latte).

Le IgE specifiche anti-Asp f 6 sarebbero in grado di

Tabella I. IgE per Pru p 3 e/o Bet v 1 e/o Bet v 2 in soggetti con IgE per la mela.

pazienti	melaKU/L	Pru p 3KU/L	BetullaKU/L	Bet v 1KU/L	Bet v 2 KU/L
1	9.92	19.9	<0.35		
2	1.26	1.86	<0.35		
3	1.51	2.66	<0.35		
4	2.24	1.62	<0.35		
5	1.99	1.14	4.61	4.99	<0.35
6	8.09	3.74	45.6	<0.35	23.2
7	7.00	<0.35	57.7	47.7	11.7
8	1.92	1.29	<0.35		
9	1.28	1.6	0.46		
10	3.46	<0.35	40.0	47.1	<0.35
11	15.8	12.8	<0.35		
12	2.01	<0.35	15.3	<0.35	6.90
13	3.18	9.58	<0.35		
14	1.00	1.47	<0.35		
15	1.08	2.11	<0.35		
16	9.89	14.7	<0.35		
17	8.28	2.91	>100	>100	44.9
18	7.32	9.01	0.37		
19	1.47	<0.35	1.61	<0.35	<0.35
20	0.64	<0.35	45.8	44.5	<0.35
21	0.65	<0.35	6.85	<0.35	2.39
22	0.96	<0.35	14.3	19.7	<0.35
23	0.97	<0.35	11.6	7.0	<0.35
24	0.76	12.7	<0.35		
25	0.87	0.63	12.4	10.6	<0.35

identificare il 99% dei soggetti con asma da aspergillo¹⁰.

In 47 soggetti con IgE specifiche per *Aspergillus fumigatus* superiori a 1 KU/L, studiati presso il nostro laboratorio da agosto 2008 a maggio 2009, è stata rilevata la positività per Asp f 6 in 8 soggetti (17%), di cui 3 affetti da fibrosi cistica.

Allergeni molecolari delle Rosacee

Nell'estratto di pesca è stata identificata la Lipid Transfer Protein (LTP o Pru p 3), un allergene molecolare di notevole interesse nella gestione dei soggetti con ipersensibilità a frutta o alimenti di origine vegetale, molto rappresentata in Italia¹¹.

Altamente diffuso nel mondo vegetale, le LTP sono presenti soprattutto a livello della buccia della frutta appartenente alla famiglia delle Rosacee o Prunoidee, ma anche nelle noci e nocciole, nella birra, nella grappa e nella mostarda. Questo allergene è termostabile e gastroresistente ed è in grado di provocare reazioni anche sistemiche nel 60% dei pazienti con IgE verso questo antigene.

I livelli anticorpali delle IgE per Pru p 3 e delle IgE per Bet v 1 possono dipendere dalla distribuzione geografica della popolazione in esame e tali differenze possono essere dovute alla diversa esposizione pollinica e alle abitudini alimentari¹².

Nella nostra esperienza l'approfondimento diagnostico si esegue in caso di IgE per la mela superiori a 0.50 KU/L, determinando le IgE per Pru p 3 e per Betulla; successivamente con IgE per betulla superiori a 0.50 KU/L si approfondisce con Bet v 1 e Bet v 2.

Nella nostra casistica di 25 soggetti con IgE specifiche per mela superiori a 0.50 KU/L, sono stati rilevati i risultati riportati in Tabella I.

Il significato diagnostico di ciascun allergene molecolare può essere attribuito solamente sulla base della sintomatologia clinica (Tab. I)

Allergeni molecolari delle Leguminose

Gli allergeni molecolari delle arachidi sono stati identificati in: Ara h 1 (vicilina), Ara h 2 (2S-Albumin - Seed Storage Protein), Ara h 3 e 4 (11S globulina), Ara h 5 (profilina), Ara h 8 (PR-10, analoga al Bet v 1).

Ara h 2 è la molecola che più spesso viene coinvolta nell'ipersensibilità all'arachide ed è fortemente cross-reattiva con Ara h 6, una altra 2S-albumina, correlata all'ipersensibilità alle arachidi^{13,14}.

La diversa reattività a questi due allergeni molecolari è dovuta soprattutto alla modalità di preparazione dell'alimento; in particolare la tostatura delle arachidi che viene effettuata negli Stati Uniti, differente da quella europea, incrementa l'espressione di questi antigeni molecolari altamente allergizzanti e termoresistenti¹³.

Nella nostra esperienza, nel periodo tra settembre 2008 e maggio 2009, in 65 soggetti positivi alle arachidi, 5 hanno presentato IgE per Ara h 2 superiori a 2KU/L e una storia clinica significativa di reazione grave all'assunzione dell'alimento.

Allergeni molecolari del Lattice

Anche per il lattice sono state identificate una serie di

molecole verso cui sono dirette le IgE dei soggetti sensibilizzati. In letteratura vengono riportati studi focalizzati su tre di queste molecole Hev b 1 (Rubber Elongation Factor), Hev b 5 (Acidic Structural Protein) ed Hev b 6.01 (Endochitinase, Hevein Precursor). La sensibilizzazione a Hev b 1 indicherebbe una esposizione neonatale caratteristica dei pazienti con spina bifida (Fig. 2), mentre gli altri due antigeni molecolari sono presenti nei soggetti esposti al latte per motivi di professionali e sono responsabili della crossreattività alla frutta esotica¹⁵.

Conclusioni

La diagnostica molecolare allergologica ci permette di identificare il profilo di immuno-sensibilizzazione dei soggetti allergici.

Mediante l'applicazione di regole di reflex testing, è possibile gestire questo tipo di diagnostica in maniera efficace, eseguendo gli allergeni molecolari solo nei soggetti sensibilizzati e, quindi, contenendo i costi.

L'introduzione nei referti di commenti correlati ai risultati in vitro, permette di fornire indicazioni in grado di orientare la diagnosi e l'eventuale immunoterapia (Tab. II).

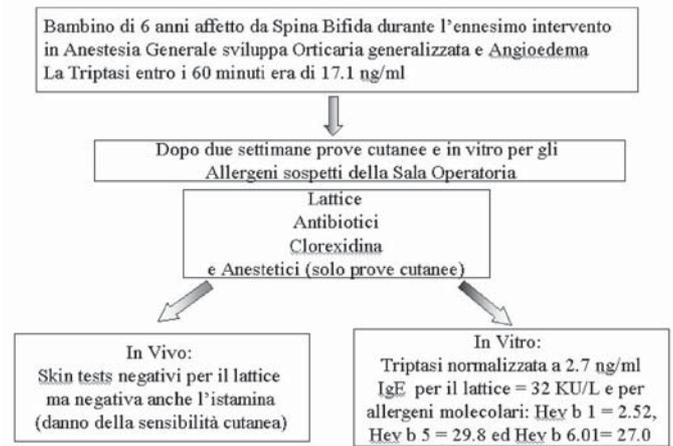


Figura 2. Caso clinico di ipersensibilità al latte neonatale.

Bibliografia

- Vrtala S. From allergen genes to new forms of allergy diagnosis and treatment. *Allergy* 2008; 63:299-309.
- Harwanegg C, Laffer S, Hiller R, Mueller MW, Kraft D, Spitzauer S, et al. Microarrayed recombinant allergens for diagnosis of allergy. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:7-13.

Tabella II. Flow chart degli allergeni molecolari e commenti di refertazione.

Flow chart: titoli IgE soglia	Allergene	Allergene molecolare	Commento
betulla >0.50 KU/L		Bet v 1 e Bet v 2	Bet v 1: allergene molecolare comune a pollini e alimenti vegetali sensibile a cottura e digestione
mela e/o pomodoro e carota >0.50 KU/L	Betulla se >0.50	Bet v 1 e Bet v 2	Bet v 2: allergene molecolare comune a pollini e alimenti vegetali resistente a cottura e sensibile alla digestione
betulla, graminacee e parietaria >0.50 KU/L		Bet v 4	Bet v 4: allergene molecolare comune a pollini di piante ed erbe
acari >10 e/o gambero >1 KU/L		Tropomiosina	Allergene molecolare comune ad acari e crostacei
mela e/o pesca >0.50 KU/L		Pru p 3	Allergene molecolare comune delle Rosacee resistente a cottura e alla digestione
graminacee >3 KU/L		Phl p 1 e Phl p 5	Allergene molecolare comune a pollini delle graminacee
farina di grano >1 KU/L		Omega-5-gliadina	Allergene molecolare comune delle farine: probabile anafilassi/asma da esercizio fisico
graminacee >30 KU/L	Farina di grano se >1	Omega-5-gliadina	
arachide >1 KU/L		Ara h 2	Allergene molecolare di probabile reazione alle arachidi
Aspergillus fumigatus >1 KU/L		Asp f 6	Allergene molecolare comune delle muffe
latte >1 KU/L		Hev b 1 Hev b 5 Hev b 6.01	Hev b 1: probabile sensibilizzazione neonatale Hev b 5 e 6.01: probabile sensibilizzazione professionale e crossreattività con frutta esotica

3. Radauer C, Breiteneder H. Pollen allergens are restricted to few protein families and show distinct patterns of species distribution. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:141-7.
4. Ferreira F, Hoffmann-Sommergruber K, Breiteneder H, Pettenburger K, Ebner C, Sommergruber W, et al. Purification and characterization of recombinant Betv 1, the major Birch Pollen Allergen. *J Biol Chem* 1993; 268:19574-80.
5. Mevére R, Westrischnig K, Svensson M, Hayek B, Bende M, Pauli G, et al. Different IgE Reactivity Profiles in Birch-Pollen Sensitive Patients from six European Populations Revealed by Recombinant Allergens: An Imprint of Local Sensitization. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 128:325-35.
6. Mothes N, Valenta R, Spitzauer S. Allergy testing: the role of recombinant allergens. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 125-32.
7. Matsuo H, Dahlstrom J, Tanaka A, Kohno K, Takahashi H, Furumura M, et al. Sensitivity and specificity of recombinant omega-5-gliadin-specific IgE measurement for the diagnosis of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Allergy* 2008; 63:233-6.
8. Weghofer M, Thomas WR, Kronqvist M, Mari A, Purohit A, Pauli G, et al. Variability of IgE reactivity profiles among European mite allergic patients. *Eur J Clin Invest* 2008; 38:959-65.
9. Lopata AL, Lehrer SB. New insights into seafood allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2009; 9:270-7.
10. Hemmann S, Nikolaizik WH, Schoni MH, Craneri R. Differential IgE recognition of recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens by cystic fibrosis patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis or *Aspergillus* Allergy. *Eur J Immunol* 1998; 28:1155-60.
11. Asero R, Antonicelli L, Arena A, Bommarito L, Caruso B, Crivellaro M, et al. Epidem AAITO: Features of food allergy in Italian adults attending allergy clinics: a multi-centre study. *Clin Exp Allergy* 2009; 39:547-55.
12. Gamboa PM, Caceres O, Antepará I, Sanchez-Monge R, Ahrazem O, Salcedo G, et al. Two different profiles of peach allergy in the north of Spain. *Allergy* 2007; 62:408-14.
13. Boulay A, Houghton J, Gancheva V, Sterk Y, Strada A, Schlegel-Zawadzka M, et al. A EuroPrevall review of factors affecting incidence of peanut allergy: priorities for research and policy. *Allergy* 2008; 63:797-809.
14. Lehmann K, Schweimer K, Reese G, Randow S, Shur M, Becker WM, et al. Structure and stability of 2S albumin-type peanut allergens: implication for the severity of peanut allergic reactions. *Biochem J* 2006; 395:463-72.
15. Yeang HY. Natural rubber latex allergens: new developments. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4:99-104.